

## İÇME SÜTÜNDE CHLORAMPHENİCOL KALINTILARININ ENZİM IMMUNOLOJİK TEST ÇUBUKLARI METODU İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Özer ERGÜN\*, Dr. Ali BİLGİÇ\*\*

\*I.Ü. Veteriner Fak. Besin Hijyeni ve Tek. Anabilim Dalı

\*\*I.Ü. Veteriner Fak. Biyokimya-Fizyoloji Anabilim Dalı

### ÖZET

*Istanbul piyasasından toplanan 75 adet pastörize süt numunesi Enzim İmmunolojik Test Çubukları metodu ile Chloramphenicol kalıntıları yönünden incelenmiş ve sonuçta bir numunede Chloramphenicol tesbit edilmiştir. Çalışmada uygulanan bu metod 1 ppb-ml süt hassasiyetinde olup süresi yaklaşık sadece 30 dk. dir.*

*Anahtar Kelimeler: Süt, chloramphenicol enzim immunolojik test çubukları*

### SUMMARY

*Investigation of Chloramphenicol Remainder by Enzyme Immunological Test Stick in Milk*

*Seventy-five pasteurized milk samples collected in Istanbul market and chloramphenicol residues were investigated by Enzyme Immunological deep stick tests. Chloramphenicol residue was detected in one of the samples. This method has the accuracy of 1 ppb/ml milk and test time is nearly 30 minutes.*

*Key Words: Milk, chloramphenicol, enzyme immunological test stick*

### GİRİŞ

Hayvanların tedavisinde kullanılan ilaçların insan gıdalarında bıraktıkları zararlı sayılabilecek substanslarına veya metabolitlerine "Kalıntı" adı verilir.

Chloramphenicol (CAP) antibiyotikler içerisinde gıdalardaki kalıntıları ile insanlarda meydana getirdiği sekonder tesirler yönünden en tehlikeli olanıdır. Öyleki, CAP gıdalarda en düşük kalıntı konsantrasyonlarında bile insanlarda aplastik anemiye neden olabilmektedir (1,2).

CAP ısıya çok dayanıklı olduğundan gıdalardaki kalıntılarının ısı işlemi ile inaktive edilmeleri de mümkün değildir. Petz (3)'e göre 10 dakika kaynamış yumurtadaki CAP miktarı kaynama öncesinden farklı olmamaktadır. Bu nedenle çeşitli ülkeler çıkardıkları yönetmeliklerle, CAP'ın süt hayvanlarında ve yumurta tavuklarında kullanılmasını yasaklamışlardır (1). Ayrıca süt ve süt ürünleri ile yumurta ve yumurtalı ürünlerde 0.001 ng CAP/kg gibi maksimum sınır değerler tespit edilmiştir. Ancak bu sınır değer et ve et ürünleri için

10 µg/kg olarak bildirilmektedir (1).

CAP'ın gıdalardaki olası kalıntılarını tespit için çok çeşitli metodlar uygulanmıştır. Bunlar arasında mikrobiyolojik testler (4,5), ince tabaka kromatografisi (6), gaz kromatografisi (7), yüksek basınçlı likit kromatografisi (8), Radio immuno assay (9) ve enzim immunolojik (10) metodlar öncelikle sayılabilir.

### MATERYAL METOD

**Materyal:** CAP kalıntıları yönünden incelenmek üzere 75 pastörize süt örneği İstanbul piyasasından orijinal ambalajları içerisinde toplandı.

**Araç ve Malzemeler:** Antiserum, fetal dana serumu, konjugat, 3-3'-5-5'- Tetramethylbenzidin, Fosfat Buffer, Sitrat Buffer, substrat çözeltisi, yıkama çözeltisi (0.15 mol/NaCl + % 0.25 Tween 20), test çubukları (pall immunodyne immuno affinity membran), santrifüj, spektrofotometre (MR 580 Microelisa Auto Reader) ayarlanabilir mikropipet ve uçları.

**Numunenin hazırlanması:** Süt numuneleri, 3000



devirde 15 dk. süre ile yağları alındıktan sonra direkt uygulamaya koyuldu.

**Metod:** Toplanan süt numunelerinde, CAP kalıntıları Schneider, Martlbauer ve Terplan (11) ile Schneider (12)'in geliştirdikleri enzim immunolojik test çubukları metodu ile aranmıştır.

**Testin uygulanışı:** Elisa-Test çubukları ile yapılan bu testin uygulanışı aşağıdaki gibidir.

**Kaplama:**

1- Önceki test çubukları özel antikorlar ile kaplanarak 37° C lik etüvde 1 saat kurutulur.

**Doyurma:**

2- Daha sonra çubuklar %10'luk FCS/PBS (fötal dana serumu/fosfat buffer) çözeltisi içinde 15 dk. tutulduktan sonra 30 dk. kurutulur.

**Saklama:**

3- Bu test çubukları oda ısısında, ışık sızdırmayan alüminyum folyo içerisinde en azından 5 ay saklanabilir.

**İnkübasyon:**

4- Test çubukları 1 ml süt örneği/Enzim Konjugat çözeltisi içerisinde 20-30 dk. inkübe edilirler (1 tüp içinde negatif kontrol için % 10 metanol/PBS koyulur).

**Yıkama:**

5- Test çubukları önce NaCl-Tween 20 çözeltisi içerisinde 5-10 dk. yıkandıktan sonra 5 dk. PBS çözeltisi içinde tutularak yıkanır.

**Substrat:**

6- Test çubukçukları substrat eriyiği içerisinde 5 dk. inkübe edilir.

**Okuma:**

7- 5 dk. sonra test çubuklarında renk oluşumuna göre değerlendirme yapılır. Negatif kontrol örneği koyu mavi renk verirken pozitif numuneler açık maviden-beyaza kadar azalan tonlarda bulunurlar. Negatif kontrol test çubuğu ile aynı renk tonunda olanlar negatif olarak değerlendirilir.

## BULGULAR

75 adet pastörize içme sütü numunesinin incelenmesi neticesinde sadece 1 örnekte CAP kalıntısı olduğu tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA

Mastitis ve diğer hayvan hastalıklarının tedavisinde antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanılmasından sonra sütlerde antibiyotik kalıntılarının varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (13,14). Antibiyotikler arasında penicillin, penicillin-streptomycin kombinasyonları ve tetrasiklinler en çok kullanılanlar olup CAP, rapide en son çare olarak kullanılmaya gelmiştir. Çünkü CAP kalıntıları sekonder tesireler yönünden diğer antibiyotiklerin kalıntısına göre en tehlikeli olanıdır (2). Bu olumsuz özelliğinden dolayı tedbir olarak CAP'ın süt hayvanlarında ve yumurta tavuklarında kullanılması çeşitli ülkelerde yasaklanmıştır. Süt ve süt ürünlerindeki maksimum sınır değerinin de 0.001 mg/kg (1 ppb) olabileceği bildirilmiştir (1).

Ayrıca diğer korunma tedbirleri olarak şunlar sıralanabilir:

a) CAP ve bunun gibi antibiyotiklerle tedavi edilmiş hayvanların sütleri tedaviden 5 gün sonrasına kadar satışa çıkarılmamalı, geniş spektrumlu antibiyotiklerde bu süre 13 güne kadar uzatılmalıdır. Ancak CAP'ın yüksek dozda tekrarlanarak uygulanması halinde kalıntılarının süte geçme süreleri oldukça uzamaktadır. Arnold ve Somogyi (15) yaptıkları çalışmada 30 mg CAP/kg miktarını subkutan olarak uygulamışlar ve bunu 12 sonra tekrar bulmuşlardır. Neticede maksimum kalıntı değerlerinin 6-30 ppm olduğunu gözlemişler ve bu miktarın 40 gün süre ile 1 ppb'nın üzerinde seyrettiğini tesbit etmişlerdir.

b) Süt fabrikalarına gelen sütlerde antibiyotik aranmalı ve kalıntı taşıyan sütler geri çevrilmelidir.

c) Sütte antibiyotik kontrolleri için güvenilir ve çabuk sonuç verebilecek metodlar geliştirilip uygulamaya konulmalıdır.

Bu hususlar CAP için kullanma yasağı ve kalıntılarında maksimum sınır değerler getirmemiş



olan ülkelerin ürünlerinin kontrolünde bilhassa önem taşımaktadır.

Maksimum sınır değeri 0.001 mg CAP/kg'in emin bir şekilde tesbitinde immünolojik ve radyoimmünolojik metodlar en uygun olanlarıdır (7,9,10).

Kimyasal ve mikrobiyolojik metodlar, HPLC ve gaz kromatografisinin CAP tespitinde arzu edilen hassasiyette olmadığı bildirilmiştir (1). Gaz kromatografisinde ekstraksiyon ve örnek hazırlanmasının da zaman alıcı ve zahmetli olması ayrıca dezavantajdır.

Elisa testinde ölçüm hataları olmamakla beraber, bütün immünolojik metodlarda olduğu gibi çeşitli nedenlerden kaynaklanan teste özel hatalar meydana gelebilmektedir. Ancak gerek Elisa ve gerekse RIA metodları ile bütün gıda maddelerinde 0.2+0.50/µg CAP/kg miktarı tespit edi-

lebilmektedir (1). Böylece her iki metod da sütte önerilen 1 ppb ve ette önerilen 10 ppb maksimum sınır değerlerini yeterli bir güvenilirlikle vermektedir.

Schneider ile Terplan (12)'in geliştirdikleri ve bu çalışmada kullanılan metod, (modifiye edilmiş ve test çubukları ile uygulanan) enzim immünolojik bir methodur. Aynı araştırmacılar bu metod ile gıda ve yem maddelerinde Aflatoksin B<sub>1</sub>, Aflatoksin M<sub>1</sub>, Diacetoxyscirpenol T-2 toksin, Ochrotoksin A ve Zearalonun'da tesbit ettiklerini bildirmişlerdir.

Test çubukları ile sütte chloramphenicol tesbitinde süt örnekleri hiç bir ekstraksiyon işleminden geçirilmeksizin sadece yağı alındıktan sonra, seyretilmeden direkt olarak test edilmişlerdir. Uygulanan bu metodun hassasiyeti 1 ng CAP/ml süttür.

## KAYNAKLAR

1. Beck M, Unters U. Milch eim und fleisch auf chloramphenicol-rücksteinde: Vergleich einer radioimmunoassays (RIA) mit einem enzymimmunologischen Verfahren (ELISA). Diss Med Vet München 1987.
2. Gross BJ, Branchflower RV, Burke TR, Lees DE und Pohl LR. Bone marrow toxicity in vitro of chloramphenicol and its metabolites. Toxicol and Appl Pharmacol 1982; 64: 557-65.
3. Petz M. Rücksteinde im ei nach behadlung von legehennen mit chloramphenicol und furazolidon. Arch Lebensmittelhyg 1984; 35: 5-24.
4. Terplan G und Zaadhof K-J, Zum vorkommen und nachweis von Hemmstoffen in der Milch eine kurze. Übersicht-Milchwiss 1967; 22: 761-70.
5. Singer CJ und Katz SE. Microbiological assay for chloramphenicol residues. J Assoc Anal Chem 1985; 68: 1037-41.
6. Pietta P. Simplified thin-layer chromatographic method for the simultaneous determination of chloramphenicol. J Chromatogr 1979; 177: 177-9.
7. Löscher W, Dornheim O und Müller F. Chloramphenicol in der muskulatur von Schlacttieren. Rückstandsuntersuchungen mit einer hochempfindlichen gaschromatographischen. Methode Arch Lebensmittelhyp 1985; 36: 101-24.
8. Kutler R, Jahr D und Stritzinger H. Nachweis und bestimmung von chloramphenicol mit HPLC und GC/MS. Fleischwirtsch 1982; 62: 515-6.
9. Arnold D, Berg D, Boertz AK, Mallick U und Somogy A. Radioimmunologische bestimmung von chloramphenicol-rückstanden in muskulatur. Milch und Eiem Arch Lebensmittelhyg 1984; 35: 131-6.
10. Campbell GS. Mageau RP, Schwab B und Johnston RW, Detektion und quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1984; 25: 205-11.
11. Schneider E, Manlbauer E und Terplan G. ELISA-teststreifenverfahren zum nachweis von mykotoxinen und pharmakologische wirksamen substanzen in der milch. 29. Arbeitstagung des Arbeitsgebiets Lebensmittelhyg der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, E.U. vom 13.9-16.9.1988 in Garmisch-Partenkirchen 1988; 328-31.
12. Schneider E. Entwicklung und anwendung von enzym-immunologischen teststreifen-verfahren zum nachweis von niedermolekularen rückstanden (mykotoxine, chloramphenicol). Diss Vet Med München 1991.
13. Gedek W. Hemmstoffe in der milch: Alte und neue fragen. Deutsch MolK Zeitung 1984; 105(50): 1779-87.
14. Haaland MA, Manspeaker JE, Moreland TW. Antibiotikarückstände in der milch nach intrauteriner infusion. Milchwiss 1985; 40 (7) : 439.
15. Arnold D und Somogyi A. Chloramphenicol residues in edible tissues of food animals. Zite: Beck M. (1987) Unters. v. Milch, Eiem und Fleisch auf Chloramphenicol Rückstände. Diss Vet Med München 1986.